



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 12 565 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
A 61 K 41/00
A 61 K 33/02

⑦① Aktenzeichen: 197 12 565.4
⑦② Anmeldetag: 25. 3. 97
④③ Offenlegungstag: 1. 10. 98

DE 197 12 565 A 1

⑦① Anmelder:
Stief, Thomas W., Dr., 35415 Pohlheim, DE

⑦④ Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,
Anwaltssozietät, 80538 München

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
J. Antimicrobiol. Chemotherapy 17, Suppl. A, S.19-24, 1986;
Photochem. Photobiol. 65 (4), S.714-722, 1997;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Arzneimittel auf der Basis eines Singulett-Sauerstoff erzeugenden Agenzes

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein Agenz oder dessen Vorstufe enthält, das Singulett-Sauerstoff und/oder Photonen erzeugt. Das erfindungsgemäße Agenz ist von einer Anregungsbestrahlung unabhängig.
Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Stabilisatoren für eine derartige pharmazeutische Zusammensetzung sowie ein Verfahren zur Behandlung von Blut bzw. Blutprodukten mit der erfindungsgemäßen Zusammensetzung.

DE 197 12 565 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend ein Agens, das Singulett-Sauerstoff bzw. Photonen erzeugt, sowie ein Verfahren zur Behandlung von Blut bzw. Blutprodukten mit der erfindungsgemäßen Zusammensetzung.

Die Erfindung betrifft außerdem Stabilisatoren für eine solche Zusammensetzung.

Zahlreiche Erkrankungen des Menschen sind bedingt durch Erreger oder Gewebeformen, gegen die kein adäquates Gegenmittel bekannt ist. Beispielsweise sind Infektionserkrankungen, hervorgerufen durch Viren, insbesondere durch HIV-Viren, durch Parasiten, Pilze oder Bakterien sowie Erkrankungen an Neutropenie, ausgeprägte Thrombosen oder Krebs häufig äußerst schwerwiegend für den betroffenen Patienten bis hin zu tödlichem Ausgang.

Einige dieser Erkrankungen sind durch intensive in vitro-Bestrahlung mit Licht, z. B. durch Bestrahlung von Plasmaprodukten, therapierbar. Die Inaktivierung von Viren in Plasmaprodukten kann über eine oxidative Zerstörung der infektiösen Partikel erfolgen. Die Lipidhülle von beispielsweise HIV-Viren enthält wesentlich mehr Cholesterin als normale menschliche Zellen. Cholesterin ist aber ein ausgezeichneter Reaktionspartner für Singulett-Sauerstoff. Zur Inaktivierung der Lipidhülle wird demzufolge Methylenblau in Kombination mit einer mehrminütigen Beleuchtung (Anregungsbestrahlung) der Plasmapräparate eingesetzt. Der dabei entstehende Singulett-Sauerstoff ist das eigentliche desinfizierende Agens. Die Bestrahlung/Beleuchtung ist jedoch teilweise apparativ aufwendig und wegen unerwünschter Nebenwirkungen möglicherweise sogar gesundheitsschädlich.

Der vorliegenden Erfindung lag das technische Problem zugrunde, eine pharmazeutische Zusammensetzung anzugeben, die ohne Anregungsbestrahlung die gewünschte pharmazeutische Wirkung entfaltet.

Dieses Problem wird erfindungsgemäß gelöst durch eine pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend ein von einer Anregungsbestrahlung unabhängiges Singulett-Sauerstoff- und/oder Photonenerzeugendes Agens oder eine Vorstufe desselben.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann sowohl in vitro wie auch in vivo angewendet werden. Als Singulett-Sauerstoff erzeugendes Agens kommen zahlreiche Agenzien in Betracht, sofern sie über eine genügende physiologische Akzeptanz verfügen und Singulett-Sauerstoff und/oder Photonen erzeugen können, ohne daß sie einer Anregungsbestrahlung bedürfen. Es können auch Vorstufen des Agenzes eingesetzt werden, die im Organismus oder in dem Milieu, in das sie eingebracht werden, zu dem eigentlichen Agens umgewandelt werden.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß es körpereigene Substanzen gibt, die Singulett-Sauerstoff und/oder Photonen ($^1\text{O}_2/\text{hv}$) erzeugen können. Diese Substanzen können zum Heilen oder Lindern von Krankheitssymptomen eingesetzt werden, die gegenüber der Einwirkung von Singulett-Sauerstoff empfindlich sind. Solche Singulett-Sauerstoff- und/oder Photonen-sensitive Erkrankungen sind solche, bei denen das pathologische Agens durch $^1\text{O}_2$ und/oder hv inaktiviert werden kann, wobei die erforderliche Konzentration an Singulett-Sauerstoff für die Inaktivierung des pathologischen Agenzes für die normale gesunde Zelle noch nicht toxisch ist.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung eignet sich vorzugsweise als Antiinfektanz, Immunstimulanz, Antithrombotikum und/oder Cytostatikum, wobei der Einsatz als Antivirikum besonders bevorzugt ist. Die erfindungsgemäße Zusammensetzung läßt sich besonders wirkungsvoll einsetzen zum Bekämpfen von lipidumhüllten Viren oder viral infizierten Zellen, wobei diese durch die Einwirkung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung inaktiviert werden.

In ganz besonders bevorzugter Weise wird die pharmazeutische Zusammensetzung zur Inaktivierung von HI-, HBV-, HCV- oder Herpes-Viren oder von virusinfizierten Zellen eingesetzt.

Als Singulett-Sauerstoff erzeugendes Agens kommen sämtliche Substanzen in Betracht, die in einem wäßrigen Milieu bei Kontakt mit Sauerstoff entweder direkt Singulett-Sauerstoff erzeugen oder Vorstufen eines solchen Agenzes, wobei die Vorstufe in dem wäßrigen Milieu in das Singulett-Sauerstoff erzeugende Agens umgewandelt wird. Vorzugsweise wird das Agens ausgewählt aus einer unterhalogenischen Säure, einem Salz einer unterhalogenischen Säure, einer stabilisierten Form davon, einer Vorstufe der stabilisierten Form, einem synthetischen Halogenamin. Zur Erzeugung der Photonen wird vorzugsweise ein Lichtleiter eingesetzt, der dem zu behandelnden Medium die Photonen zuführt. Als ganz besonders bevorzugte Agenzien werden HOCl, ein Salz davon oder das N-chlorierte Taurin (decarboxylierte Cysteinsäure) eingesetzt. Die Wirkung dieser physiologischen Substanzen kann imitiert werden beispielsweise durch die Applikation von synthetischen Chloraminen, wie Chloramin T® oder Chloramin B®, oder die gegen Staphylokokken wirksamen Antibiotika, die Singulett-Sauerstoff freisetzen, wie Vancomycin oder Phosphomycin, oder durch das Zuführen von Photonen mit Hilfe von Lichtleitern.

Stabilisatoren bzw. stabilisierte Formen des Agenzes sind Substanzen, die das Oxidationspotential des Agenzes bewahren, d. h. sie stabilisieren beispielsweise das Chlor und verhindern dessen Freisetzung. Geeignete Stabilisatoren sind beispielsweise Taurin, Carbonatsalze wie z. B. Natrium(hydrogen)carbonat oder Mono-, Di- oder Oligosaccharide. NaHCO_3 liegt vorzugsweise in einer Konzentration von 50–500 mmol/l mit einem alkalischen pH-Wert von vorzugsweise 7,4 bis 10,5 vor. Die Mono-, Di- oder Oligosaccharide werden bevorzugt in einer Konzentration von 25 bis 100% bei einem alkalischen pH von 8 bis 10,5 eingesetzt.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung ist besonders wirkungsvoll in einem Endkonzentrationsbereich des Agenzes von 0,01 bis 20 mmol/l, wobei dies 0,06 bis 120 mmol pro 75 kg Körpergewicht entspricht. Besonders bevorzugt ist der Konzentrationsbereich von 0,1 bis 5 mmol, wobei dies 0,6 bis 30 mmol pro 75 kg Körpergewicht entspricht. Der am meisten bevorzugte Konzentrationsbereich liegt zwischen 0,3 bis 2 mmol/l, wobei dies 1,8 bis 12 mmol pro 75 kg Körpergewicht entspricht. In dem Bereich von 0,3 bis 2 mmol/l ist das Verhältnis von unerwünschter Schädigung körpereigener Proteine, wie oxidationsempfindlicher Hämostaseproteine, zu dem gewünschten inaktivierenden Effekt auf die pathogenen Substanzen und Gewebeformen besonders gut. So werden beispielsweise bei einer Konzentration von weniger als 2 mmol/l des erfindungsgemäßen Mittels im Plasma oxidationsempfindliche Hämostaseproteine wie Fibrinogen, Faktor V, Faktor VIII oder α -2-Antiplasmin weniger als 25% inaktiviert, während die pathogenen Substanzen und Gewebeformen um den Faktor 100 bis 1000 inaktiviert werden. Die erfindungsgemäße Zusammensetzung eignet sich in besonders bevorzugter Weise zur Desinfektion von Blutkonserven bzw. Blutprodukten, wobei die Zusammensetzung in vi-

iro eingesetzt wird.

Beispielsweise wird bei Verwendung von Taurin-Chloramin als Wirksubstanz in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung eine Konzentration von 60 mmol/l Taurin-Chloramin in einer Lösung mit 600 mmol/l Taurin (im allgemeinen 5 bis 15fachmolarer Überschuß an Taurin gegenüber Taurin-Chloramin) mit alkalischem pH-Wert (vorzugsweise pH 8), die weiterhin vorzugsweise durch 100 mmol/l NaHCO₃ stabilisiert ist, eingesetzt. Diese Lösung wird vorzugsweise in einem Gesamtvolumen von 50 ml (oder bei halber Konzentration der entsprechenden Substanz in dem doppelten Gesamtvolumen) innerhalb von ca. 5 Minuten systemisch verabreicht.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zum Desinfizieren und/oder Stabilisieren von Blut, insbesondere Plasma, und Blutprodukten, dadurch gekennzeichnet, daß Blut bzw. Blutprodukte mit einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1-13 in Kontakt gebracht wird, sowie ein Verfahren, wobei Viren selektiv inaktiviert werden und Oxidations-empfindliche Plasmaprobleme geschützt werden, das folgende Schritte enthält:

- das mit dem Stabilisator versehene Blut oder Blutderivat wird mit Singulett-Sauerstoff behandelt;
- nach einer 1 bis 60minütigen, vorzugsweise 5 bis 30minütigen Inkubation mit einem Singulett-Sauerstoff-Freisetzer, vorzugsweise einem Halogenamin, wird die Oxidation mit einem 10fach molaren Überschuß an einem Antioxidans wie Ascorbinsäure beendet; und
- der gegebenenfalls verstellte pH-Wert wird wieder auf pH 7,4 eingestellt.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung eignet sich somit zum Desinfizieren und/oder Stabilisieren von Blut, insbesondere Plasma, sowie von Blutprodukten, indem die erfindungsgemäße Zusammensetzung in das zu behandelnde Produkt eingebracht wird, und besonders zur Bekämpfung von Infektionen, zur Immunstimulierung, zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Thrombosen und/oder zur Hemmung des Zellwachstums.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

Antithrombotische Wirkung von ¹O₂/hv

a) Thrombinzeit (TZ)

50 µl Citratplasma von n = 6 Gesunden wurde mit 50 µl 0, 2,5 oder 3,3 mmol/l Taurin-Chloramin in 7fach molarem Überschuß an Taurin, pH 7,4, 240 Sekunden bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde 50 µl Thrombinreagenz (3 NIH Einheiten/ml) (Instrumentation Laboratory, Lexington, USA) zugesetzt und die Gerinnungszeit koagulometrisch (Amelung, Lemgo, Deutschland) bestimmt.

Ergebnis

Zusatz von Chloramin	0 mmol/l	2,5 mmol/l	3,3 mmol/l
TZ (sec):	14,3	16,5	19,8
(Mittelwert aus 6 Gesunden)			

b) Prothrombinzeit (PT)

50 µl Citratplasma von n = 6 Gesunden wurde mit 50 µl 0, 2,5 oder 3,3 mmol/l Taurin-Chloramin in 7fach molarem Überschuß an Taurin, pH 7,4, 240 Sekunden bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde 100 µl Thrombinreagenz (Instrumentation Laboratory) zugesetzt und die Gerinnungszeit koagulometrisch (Amelung, Lemgo, Deutschland) bestimmt.

Ergebnis

Zusatz von Chloramin	0 mmol/l	2,5 mmol/l	3,3 mmol/l
PT (sec):	14,9	19,6	27,8
(Mittelwert)			

c) Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

50 µl Citratplasma von n = 6 Gesunden wurde mit 50 µl Phospholipidreagenz (Cephalin/Kaolin, Instrumentation Laboratory) und 50 µl 0, 2,5 oder 3,3 mmol/l Taurin-Chloramin in 7fach molarem Überschuß an Taurin, pH 7,4, 240 Sekunden bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden 50 µl CaCl₂ zugesetzt und die Gerinnungszeit koagulometrisch (Amelung, Lemgo, Deutschland) bestimmt.

Ergebnis

Zusatz von Chloramin	0 mmol/l	2,5 mmol/l	3,3 mmol/l
aPTT (sec):	44,3	67,5	94,8
(Mittelwert)			

Man erkennt, daß sowohl die Thrombinzeit als auch die Prothrombinzeit und aPTT in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an Chloramin zunimmt, d. h. das Chloramin wirkt antikoagulierend und damit antithrombotisch. Singulett-Sauerstoff-sensible Hämostaseproteine wie Fibrinogen, Faktor V und Faktor VIII werden inaktiviert.

Profibrinolytische Wirkung

50 µl Normalplasma wurde in doppeltem Testansatz mit 25 µl a) aqua dest., b) 20 mmol/l NaOCl in 100 mmol/l Taurin (Tau), 50 mmol/l NaHCO₃, pH 8, c) 20 mmol/l NaOCl in 200 mmol/l Taurin, 50 mmol/l NaHCO₃, pH 8, d) 100 mmol/l Taurin, e) 200 mmol/l Taurin, f) 20 mmol/l NaOCl, g) 20 mmol/l Chloramin T[®] und 150 µl 5 IU Urokinase/ml in 150 mmol/l Tris, 0.1% Triton X 100[®], pH 8, 90 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Daraufhin wurde 50 µl 3 mmol/l chromogenes Plasminsubstrat HD-Val-Leu-Lys-pNA in 2 M KCl zugesetzt und 30 min bei RT inkubiert.

Ergebnis

Zusatz von:	a) aqua dest.	f) NaOCl	b) NaOCl/5xTau	c) NaOCl/10xTau
Plasmin-aktivität (ΔmA)	13	133	170	220

Zusatz von:	d) 100 mmol/l Tau	e) 200 mmol/l Tau	g) Chloramin T ^R
Plasmin-aktivität (ΔmA)	21	40	246

Man erkennt, daß das aus NaOCl und Taurin spontan entstehende Taurin-Chloramin (Tau-Cl) dem Chloramin T etwa vergleichbare profibrinolytische Wirkung zeigt. Singulett-Sauerstoff-sensibles α-2-Antiplasmin und PAI-1 wird inaktiviert, Glu-Plasminogen wird aktiviert. Ein 10fach molarer Überschuß, verglichen mit einem 5fach molaren Überschuß an Taurin begünstigt die Taurin-Chloramin (Tau-Cl)-Entstehung; hier bei einer Vorinkubation von 15 Stunden bei RT. Tau-Cl bei einem 10 : 1 molaren Verhältnis aus Tau und OCl⁻ ist 10% weniger aktiv als die äquimolare Menge an Chloramin T, Tau-Cl bei einem 5 : 1 molaren Verhältnis aus Tau und OCl⁻ ist 30% weniger aktiv als die äquimolare Menge an Chloramin T. NaOCl ist 50% weniger aktiv als Chloramin T.

Vergleich der oxidierten Wirkung von Vancomycin, Tau-Cl, Chloramin T und NaOCl auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

50 µl Normalplasma wurde mit 50 µl a) 0-10 mmol/l Vancomycin, b) 0-10 mmol/l Tau-Cl (NaOCl in 7fach molarem Überschuß an Taurin, pH 7,4, 30 min bei RT vorinkubiert), c) 0-10 mmol/l Chloramin T, d) 0-10 mmol/l NaOCl, e) 35 mmol/l Taurin, f) aqua dest. 200 sec bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden 50 µl Ellagsäure/Cephalin (Instrumentation Laboratory) zugesetzt und 300 sec bei 37°C inkubiert. 50 µl Zusatz von 25 mmol/l CaCl₂ startete die Gerinnungsreaktion. Die Gerinnungszeit wurde koagulometrisch bestimmt (KC 10, Amelung, Lemgo).

Ergebnis

Zusatz	Konzentration an Zusätzen (mmol/l)						
	0	0,3	0,6	1,25	2,5	5	10
a) Vancomycin	30,2	30,8	33,3	38,6	65,9	>400	>400
b) Tau-Cl	30,2			31,0	44,8	146,4	287
c) Chloramin T	30,2			39,4	60,2	133,3	>400
d) NaOCl	30,2			30,4	43,2	157,9	>400
e) Taurin (35 mmol/l)					31,4		
f) aqua dest.							

(aPTT in Sekunden)

Man erkennt, daß das Anti-Staphylokokken-Antibiotikum Vancomycin, wie Chloramin T, antikoagulatorisch wirkt. Die Wirkung von Tau-Cl ist etwa 30% schwächer als die von Chloramin T und der von NaOCl vergleichbar.

HIV-Inaktivierung

HIV-infiziertes Vollblut wurde steigenden Konzentrationen (0–10 mmol/l) an Taurin-Chloramin (in 7fach molarem Überschuß an Taurin, pH 7,4) ausgesetzt. Nach 15 Minuten bei RT wurde das Blut 10 min bei 2000 g zentrifugiert und das Plasma im biologischen Test auf Plaque-forming-Units auf BHK-21F-Zellen untersucht.

Sogar im Vollblut findet eine Virusinaktivierung statt; – bereits Chloramin-Konzentrationen von ca. 1 mmol/l inaktivierten die Viren um mehr als das 1000fache.

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend ein von einer Anregungsbestrahlung unabhängiges Singulett-Sauerstoff- und/oder Photonen-erzeugendes Agens oder eine Vorstufe desselben.
2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 als Antiinfektans, Immunstimulans, Antithrombotikum und/oder Cytostatikum.
3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 2 als Antiinfektans und/oder Cytostatikum.
4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 3 als Antiinfektans.
5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 4 als Antivirikum.
6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5 als Inaktivator lipidumhüllter Viren oder viral infizierter Zellen.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5 oder 6 als Inaktivator von HI, HBV, HCV oder Herpes-Viren oder viral infizierter Zellen.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Agens ausgewählt wird aus einer unterhalogenischen Säure, einem Salz einer unterhalogenischen Säure, einer stabilisierten Form davon, einer Vorstufe der stabilisierten Form, einem synthetischen Halogenamin und einem Lichtleiter.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Agens ausgewählt wird aus einem Salz unterchloriger Säure, einem Chloramin, Taurin, Chloramin T[®], Chloramin B[®], Vancomycin, Phosphomycin und weiteren Substanzen, die Singulett-Sauerstoff erzeugen.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es Taurin-Chloramin enthält.
11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es in Dosierungen von 0,01 bis 20 mmol/l (0,06 bis 120 mmol/75 kg Körpergewicht), vorzugsweise von 0,1 bis 5 mmol/l (0,6 bis 30 mmol/75 kg Körpergewicht), besonders bevorzugt von 0,3 bis 2 mmol/l (1,8 bis 12 mmol/75 kg Körpergewicht) in dem zu behandelnden Milieu, vorzugsweise Blut, Plasma oder Blutprodukten, wirksam ist.
12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch ein Carbonatsalz, vorzugsweise NaHCO₃, vorzugsweise 50 bis 500 mmol/l mit einem alkalischen pH-Wert, vorzugsweise 7,4 bis 10,5, stabilisiert ist.
13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch ein Mono-, Di- oder Oligo-Saccharid in einer Konzentration von 25 bis 100% bei einem alkalischen pH, vorzugsweise 8 bis 10,5, stabilisiert ist.
14. Verfahren zum Desinfizieren und/oder Stabilisieren von Blut, insbesondere Plasma, und Blutprodukten, dadurch gekennzeichnet, daß Blut bzw. Blutprodukte mit einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1–13 in Kontakt gebracht wird.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14, wobei Viren selektiv inaktiviert werden und Oxidations-empfindliche Plasma-proteine geschützt werden, das folgende Schritte enthält:

- das mit dem Stabilisator gleichzeitig oder vor Inkubation versehene Blut oder Blutderivat wird mit einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3 1 bis 60 Minuten, vorzugsweise 5 bis 30 Minuten, inkubiert,
- die Oxidation wird mit einem 10fach molaren Überschuß eines Anti-Oxidanz, wie z. B. Ascorbinsäure, beendet; und
- der pH-Wert wird wieder auf pH 7,4 eingestellt.

16. Verwendung eines Anregungsbestrahlung-unabhängigen Singulett-Sauerstoff- und/oder Photonen-erzeugenden Agens oder einer Vorstufe davon zur Bekämpfung von Infektionen, zur Immunstimulierung, zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Thrombosen und/oder zur Hemmung des Zellwachstums.